



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

11
1C639 U.S. PTO

09/672265



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99119404.4

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

10/07/00

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.: 99119404.4
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 30/09/99
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Roche Diagnostics GmbH

68298 Mannheim

GERMANY

ETH Zürich

8092 Zürich

SWITZERLAND

Bezeichnung der Erfindung:

Title of the invention:

Titre de l'invention:

Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Holo-Citratlyase

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

C12N9/88, C12N15/60, C07K14/26, C12Q1/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Roche Diagnostics GmbH

EPO-Munich
52

5234/00/EP

30. Sep. 1999

Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Holo-Citratlyase

Das Enzym Citratlyase (EC 4.1.3.6) gilt als Schlüsselenzym des anaeroben Citrat-Abbaus und kann dementsprechend aus einer Anzahl unterschiedlicher prokaryontischer Zellen isoliert werden. Das Enzym katalysiert die Spaltung von Citrat zu Acetat und Oxalacetat. Darüber hinaus ist bekannt, daß der Enzymkomplex des heute am besten untersuchten Citratlyase-Enzyms aus *Klebsiella pneumoniae* (vormals: *Klebsiella aerogenes*) sich aus jeweils sechs Kopien drei verschiedener Untereinheiten, und zwar eine α -, β - und γ -Untereinheit, zusammensetzt und ein Molekulargewicht von etwa 550.000 Dalton aufweist. Ferner ist bekannt, daß das katalytisch aktive Zentrum in der α - und β -Untereinheit lokalisiert ist, während die γ -Untereinheit die Bindungsstelle für die prosthetische Gruppe 2'-(5"-phosphoribosyl)-3'-dephospho CoA besitzt. Diese prosthetische Gruppe ist über eine Phosphordiesterbindung an den Serinrest 14 gebunden.

Das Citratlyase-Enzym wird für die meisten Anwendungen, die vornehmlich in der klinischen Chemie und der Lebensmittelanalytik liegen, in hoher Reinheit benötigt. Daher wird angestrebt, das Enzym in aktiver Form durch rekombinante Methoden in bestimmten Wirtszellen überzu-produzieren und aus diesen zu isolieren. Ein derartiges Verfahren ist noch nicht beschrieben oder in anderer Weise bekannt gemacht worden. Üblicherweise wird daher Citratlyase heutzutage aus *Klebsiella pneumoniae*-Zellen isoliert, die unter anaeroben Bedingungen mit Citrat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet wurden. Die Citratlyase-Gene von *Klebsiella pneumoniae* wurden kloniert und sequenziert (M. Bott und P. Dimroth, Mol. Microbiol. Vol. 14, 347-356 (1994)). Diese Gene sind Teil des citC-Operons, das aus den fünf Genen citCDEFG besteht. Das citC-Gen kodiert für Citratlyase-Ligase, welche die Bildung eines Acetylthioesters katalysiert. Die Gene citD, citE und citF kodieren für die gamma-, beta- und alpha-Untereinheit der Citratlyase. Das durch citG kodierte Protein ist an der Biosynthese der prosthetischen Gruppe beteiligt. Ferner ist bekannt, daß das citC-Operon in Abwesenheit von Sauerstoff und in Gegenwart von Citrat sowie Na^+ -Ionen induziert wird; darüber hinaus ist die Expression streng abhängig vom citA/citB-Regulationssystem (M. Bott et al., Mol. Microbiol. Vol. 18, 533-546 (1995); M. Meyer et al., J. Mol. Biol. Vol. 269, 719-731 (1997)).

Die Expression der für Citratlyase kodierenden Gene aus *Klebsiella pneumoniae*, welche aus praktischen Überlegungen bevorzugt in prokaryontischen Zellen, wie z.B. *E. coli* erfolgen würde, resultiert in einer inaktiven, wenn auch löslichen Form des Enzyms (M. Bott und P. Dimroth, Mol. Microbiol. Vol. 14, 347-356 (1994)). Durch anschließende Zugabe von Acetyl-Coenzym A, das als Substituent für den Acetyl-Thioester der nativen prosthetischen Gruppe 2'-(5"-phosphoribosyl)-3'-dephospho CoA bekannt ist, kann das rekombinante Apo-Citratlyase-Enzym zum Holo-Enzym aktiviert werden (M. Bott und P. Dimroth, Mol. Microbiol. : 14(2), 347-356 (1994)). Eine solche zusätzliche Aktivierungsmaßnahme ist jedoch umständlich und aufwendig. Darüber hinaus ist der zwingende Zusatz von Acetyl-CoA für den kommerziellen Vertrieb von Citratlyase bzw. der Apo-Form ungeeignet, da die Substanz bei längerer Lagerung bei 4°C zerfällt.

Aufgabe der zugrunde liegenden Erfindung ist daher, eine rekombinante, lösliche und zugleich aktive Holo-Citratlyase zur Verfügung zu stellen, womit die Nachteile der bekannten Maßnahmen ausgeräumt werden.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit Citratlyase-Aktivität, indem ein geeignetes Plasmid in einem Wirtsorganismus exprimiert wird und das Plasmid die Information von einem aus mindestens sechs Genen bestehenden Gencluster sowie einen induzierbaren Promotor aufweist. Die den Gencluster ausmachenden Gene kodieren für bestimmte Untereinheiten des Proteins mit Citratlyase-Aktivität und/oder für an der Biosynthese des vollständigen Enzyms beteiligte Komponenten. Insbesondere enthält ein geeignetes Plasmid die Gene *citC*, *citD*, *citE*, *citF*, *citG* und ein beispielsweise aus *E. coli* erhältliches DNA-Fragment, welches zwischen den Genen *citF* und *citG* auf dem *E. coli* Citratlyase-Gencluster lokalisiert ist. Die Gene *citD*, *citE* und *citF* kodieren für die entsprechenden γ -, β - und α -Untereinheiten des Enzyms und weisen Molekulargewichte von etwa 11.000 Dalton, 32.000 Dalton bzw. 55.000 Dalton auf. Erfindungsgemäß bevorzugt ist, daß eines der Gene ein DNA-Fragment darstellt, welches für ein das Motif G(A)-R-L-X-D-L(I)-D-V enthaltendes Protein kodiert. Besonders bevorzugt ist ein entsprechendes DNA-Fragment, welches für ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 20.000 Dalton kodiert.

Weiterhin hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn eines und gegebenenfalls ein weiteres, mit dem ersten Gen fusioniertes Gen der den Gencluster ausmachenden Gene aus einem anderen Organismus stammt als die anderen Gene. Insbesondere hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn das zwischen *citF* und *citG* auf dem *E. coli* Citratlyase-Gencluster lokalisierte DNA-Fragment *citX* bzw. zu *citX* homologe Gene aus *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oder

Leuconostoc mesenteroides und eines oder mehrere der anderen Gene aus dem Mikroorganismus stammen, der für das isolierte Citratlyase-Aktivität aufweisende Protein spezifisch ist, wie beispielsweise *Klebsiella pneumoniae*. Bei *Haemophilus influenza*, *Leuconostoc mesenteroides* (S. Bekal et al., J. Bacteriol. Vol. 180, 647-654 (1998)) und *Leuconostoc paramesenteroides* (M. Martin et al., FEMS Microbiol. Lett. Vol. 174, 231-238 (1999)) treten die Gene *citX* und *citG* fusioniert auf. Entsprechende Fusionsgene weisen somit die Information von zwei Genen auf. Die resultierenden Proteine weisen ein Molekulargewicht von etwa 52.000 Dalton auf und die Aktivitäten von *E. coli* *CitX* und *CitG*, sind also bifunktionell. In Abwesenheit des *citX*-Gens oder eines zu *citG* homologen Gens bzw. eines entsprechenden *citX*-Fusionsgens konnte nach Expression lediglich die niedermolekulare Apo-Form (MG 12.000 Dalton, SDS-PAGE), nicht dagegen die Holo-Form der Citratlyase (MG 14.500 Dalton, SDS-PAGE) detektiert werden.

Als Wirtsorganismus haben sich erfindungsgemäß sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten als geeignet erwiesen. Die Tatsache, daß eine lösliche aktive Citratlyase nunmehr in Prokaryonten, wie z.B. *E. coli*, auf einfache Weise und in ausreichenden Ausbeuten ohne zusätzliche Aktivierungsmaßnahmen erfolgen kann, ist als besonders vorteilhaft zu werten.

Somit konnte gezeigt werden, daß durch Klonierung des gesamten *E. coli* *citCDEFXG* Genclusters unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie z.B. *lac*, *lac UV5*, *T5*, *tac* oder *T7*-Promotors, ein aktives Enzym mit Citratlyase-Aktivität selbst unter nicht sauerstofflimitierten Bedingungen exprimiert werden kann. Zellextrakte mit entsprechenden Expressionsplasmiden führen zu Citratlyase-Aktivitäten von etwa 4 bis 5 U/mg Protein im zellfreien Extrakt, während Zellen ohne rekombinante Citratlyase bei aeroben Wachstum keine Citratlyase-Aktivität aufweisen.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung die gleichzeitige Expression des *citCDEFG* Genclusters aus *Klebsiella pneumoniae* und des aus *E. coli* erhältlichen *citX*-Gens, wodurch selbst in Prokaryonten, insbesondere in *E. coli* eine entsprechende Citratlyase in aktiver Form gewonnen werden kann.

Hierbei konnte unter aeroben Wachstumsbedingungen eine Aktivität von etwa 8 U/mg Gesamtprotein im zellfreien Extrakt erreicht werden.

Die Reinigung des Holo-Enzyms erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. Aus etwa einem Gramm Zellen (Naßgewicht) können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren etwa 100 bis

120 µg lösliches Protein mit Citratlyase-Aktivität gewonnen werden. Die Protein-Bestimmung erfolgte nach P.K. Smith et al., Anal. Biochem. Vol. 150, 76-85 (1985), wobei Ovalbumin als Standard diente. Die spezifische Aktivität der Citratlyase beträgt ca. 70 U/mg Protein (M. Single und P.A. Srere, J. Biol. Chem. Vol. 251(10), 2911-2615 (1976)). Die Aktivität des nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Holo-Enzyms ist damit um das ca. 0,5- bis 3-fache höher als die mit Acetyl CoA und Apo-Citratlyase erreichte Aktivität.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht somit, daß erstmals ein rekombinantes lösliches und zugleich aktives Protein mit verbesserter Citratlyase-Aktivität zur Verfügung gestellt wird.

Ferner betrifft die Erfindung einen Test-Kit zur Bestimmung von Zitronensäure, welcher im wesentlichen aus folgenden Komponenten besteht: ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliches Protein mit Citratlyase-Aktivität, mindestens ein Protein mit wasserstoffübertragender Aktivität, Nicotinamid-adenin-dinukleotid oder ein entsprechendes Derivat in reduzierter Form und gegebenenfalls geeignete Stabilisatoren, Aktivatoren und/oder Substanzen zur Vermeidung bzw. Reduzierung von Störungen, d.h. die eigentliche Reaktion überlagernde oder störende Komponenten bzw. Reaktionen sowie geeignete Pufferlösungen. Als Proteine mit wasserstoffübertragender Aktivität kommen insbesondere L-Malat-Dehydrogenase und L-Lactat-Dehydrogenase in Betracht. Als Stabilisatoren sind prinzipiell solche Substanzen, Zusätze bzw. Maßnahmen geeignet, die den Abbau einer für die Bestimmung wichtigen Eigenschaft bzw. Aktivität helfen zu vermeiden oder zumindest zu verzögern. Der Zusatz von Aktivatoren kann insbesondere bei Vorlage geringer Mengen an Probenmaterial oder stark verdünnter Proben von Vorteil sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des rekombinanten löslichen Proteins mit Citratlyase-Aktivität zur Bestimmung von Zitronensäure in der klinischen Chemie, der Lebensmittelanalytik sowie zum Reinheitsnachweis von Kosmetika. In der klinischen Chemie wird ein entsprechender enzymatischer Test vor allem zur Fertilitätsuntersuchung herangezogen und bei der Beobachtung des Therapieverlaufs bei Patienten mit Nierensteinen eingesetzt. In der Lebensmittelanalytik ist die wichtigste Anwendung die Wein- bzw. Fruchtsaftanalytik.

Die enzymatische Methode beruht auf der Spaltung des Citrats durch das Enzym Citratlyase, und zwar in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen, zu Oxalacetat und Acetat. In Gegenwart von wasserstoffübertragenden Enzymen, wie z.B. L-Malat-Dehydrogenase und L-Lactat-Dehydrogenase, werden Oxalacetat und dessen Decarboxylierungsprodukt Pyruvat durch reduziertes NADH oder

NADPH zu L-Malat und L-Lactat reduziert. Die NADH- bzw. NADPH-Menge ist proportional zur Menge an Citrat und wird bei 334 nm, 340 nm oder 365 nm gemessen.

Die Erfindung betrifft daher auch einen entsprechenden Test-Kit für die Bestimmung von Zitronensäure, der – neben geeigneten Pufferlösungen – ein rekombinantes Protein mit Citratlyase-Aktivität, ein oder mehrere wasserstoffübertragende Enzyme sowie ein Nicotinamid-adenin-dinukleotid oder ein entsprechendes Derivat in reduzierter Form sowie gegebenenfalls geeignete Stabilisatoren, wie beispielsweise Thiolreagenzien aufweist.

Erläuterungen zu den Abbildungen

Abbildung 1:

A: Funktion der verschiedenen Untereinheiten in einer durch Citratlyase katalysierten Reaktion und Aktivierung des Enzyms durch Citratlyase-Ligase. HS-R steht für die prosthetische Gruppe.

B: Struktur der prosthetischen Gruppe der Citratlyase 2'-(5"-phosphoribosyl)-3'-phospho-CoA.

Abbildung 2:

Citratlyase-Gencluster aus *Klebsiella pneumoniae* (K. p.), *Escherichia coli* (E. c.), *Haemophilus influenzae* (H. i.) and *Leuconostoc mesenteroides* (L. m.) Gensequenzen, die homolog zu E. coli citX sind, sind in leicht grauer Tönung unterlegt.

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 1:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 36 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'- CCCTCTAGAGAACAACATTCGTTGCAAATCGATAAC - 3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 2:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 38 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'- CCGCGAATTCTTAGTTCCACATGGCGAGAATCGGCCAG -3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 3:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 5484 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

1 GAACAACATT CGTTGCAAAT CGATAACAAC ATGCACCTTC AGGATACTAT
rStart citC

51 TTATTATGTT CGGCAATGAT ATTTTCACCC GCGTAAAACG TTCAGAAAAT
101 AAAAAAATGG CGGAAATCGC CCAATTCCTG CATGAAAATG ATTTGAGCGT
151 TGACACCACA GTCGAAGTAT TTATTACCGT AACCCGCGAT GAAAAGCTTA
201 TCGCGTGC GG TGAATTGCC GGAAATATTA TTAAATGCGT TGCTATCAGT
251 GAATCCGTCC GCGGTGAAGG ACTGGCGCTG ACATTAGCCA CTGAATTGAT
301 AAACCTCGCC TATGAGCGGC ACAGCACGCA TCTGTTTATT TATACCAAAA
351 CCGAATACGA GCGCTGTTC CGCCAGTGCG GTTTTCCAC GCTGACCAGC
401 GTACCCGGCG TGATGGTGCT GATGGAAAAC AGCGCCACGC GACTGAAACG
451 CTATGCCGAA TCGCTGAAAA AATTTCTGCA TCCAGGGAAC AAGATTGGCT
501 GCATTGTGAT GAACGCCAAT CCCTTTACGA ATGGTCACCG TTATCTGATT
551 CAACAGGCTG CGGCACAGTG CGACTGGTTG CATCTGTTTT TAGTCAAAGA
601 AGATTCTTCA CGCTTCCCCT ATGAAGACCG GCTGGATTG GTGTTAAAAG
651 GCACCGCCGA TATTCCACGC CTGACTGTGC ATCGTGGCTC CGAATACATC
701 ATCTCCCGCG CTACGTTCCC TTGCTACTTC ATTAAAGAAC AGAGCGTCAT
751 TAACCATTGT TACACCGAAA TTGATCTGAA GATTTTCCGT CAGTACCTCG
801 CTCCCGCGCT GGGTGTAAC CACCGCTTTG TCGGTACTGA ACCCTTTTGT
851 CGCGTTACCG CCCAGTACAA CCAGGATATG CGCTACTGGC TGGAACGCC
901 GACTATCTCC GCACCGCCCA TCGAACTGGT TGAAATTGAG CGGCTGCGTT
951 ACCAGGAGAT GCCGATATCC GTTCCCGGG TACGTCAACT GCTGGCGAAA
1001 AACGATCTCA CGGCTATCGC GCCGCTGGTC CCTGCAGTCA CGCTGCATTA
1051 TTTGCAGAAC CTGCTTGAGC ACTCCCGCCA GGACGCGGCA GCTCGTCAAA

Stop citC₁ rStart citD

1101 AGACCCCCGC ATGAGAAACA GGTGAAAAT GAAAATAAAC CAGCCCGCCG
1151 TTGCAGGCAC CCTTGAGTCT GGGGATGTGA TGATACGCAT CGCCCCACTC
1201 GATACGCAGG ATATCGACCT GCAAATCAAT AGCAGCGTTG AGAAACAGTT
1251 TGGCGATGCA ATTCGCACCA CCATTCTGGA CGTTCTCGCC CGCTACAACG
1301 TGCGCGGCGT ACAGCTGAAT GTCGATGACA AAGGCGCACT GGACTGCATT
1351 TTACGTGCAC GACTGGAAGC CCTGCTGGCA CGCGCCAGCG GTATCCCGGC

Stop citD₁

1401 TCTGCCATGG GAGGATTGCC AATGATTTC GCTTCGCTGC AACAAACGTAA

lStart citE

1451 AACTCGCACC CGCCGCAGCA TGTTGTTTGT GCCTGGTGCC AATGCCGCGA
1501 TGGTCAGCAA CTCCTTCATC TACCCGGCTG ATGCCCTGAT GTTTGACCTC
1551 GAAGACTCCG TAGCATTGCG TGAAAAAGAC ACCGCCCGCC GCATGGTTTA
1601 CCACGCGCTG CAACATCCGC TGTATCGCGA TATTGAAACC ATTGTGCGTG
1651 TCAACGCGCT GGATTCCGAA TGGGGTGTTA ACGACCTGGA AGCCGTCGTT
1701 CGCGGTGGTG CGGACGTTGT GCGTCTGCCG AAAACCGATA CCGCTCAGGA
1751 TGTTCTGGAT ATTGAAAAAG AGATCCTGCG TATCGAAAAA GCCTGTGGTC
1801 GTGAACCCGG CAGCACCGGC CTGCTGGCGG CGATTGAATC TCCGCTGGGG
1851 ATTACCCGCG CAGTGGAAT CGCTCACGCT TCCGAGCGTT TGATCGGTAT

1901	CGCCCTCGGT	GCAGAAGACT	ATGTGCGCAA	CCTGCGTACA	GAACGCTCCC
1951	CGGAAGGAAC	TGAAGTGTG	TTCGCACGCT	GTTCCATTTT	GCAGGCCGCG
2001	CGCTCTGCGG	GTATTCAGGC	GTTTCGATACC	GTCTATTCCG	ACGCTAACAA
2051	CGAAGCCGGA	TTTCTGCAAG	AAGCCGCCCA	CATCAAACAG	CTGGGCTTTG
2101	ACGGCAAATC	GCTGATCAAC	CCGCGTCAGA	TTGATCTGCT	GCACAACCTC
2151	TACGCACCGA	CCCAGAAAGA	AGTGGATCAC	GCCCCGCCGCG	TCGTAGAAGC
2201	CGCTGAAGCC	GCCGCTCGCG	AAGGCCTCGG	CGTGGTTTCC	CTGAACGGCA
2251	AGATGGTGGA	CGGTCCGGTT	ATCGATCGCG	CCCGTCTGGT	GCTCTCCCGT
		Stop citE₁		Start citF	
2301	GCAGAACTTT	CCGGCATCCG	CGAAGAATAA	GGCAATCAAA	ATGACGCAGA
2351	AAATTGAACA	ATCTCAACGA	CAAGAACGGG	TAGCGGCCTG	GAATCGTCGC
2401	GCTGAATGCG	ATCTTGCCGC	TTTCCAGAAC	TCGCCAAAGC	AAACCTACCA
2451	GGCTGAAAAA	GCGCGCGATC	GCAAACGTGT	CGCCAAACCTG	GAAGAAGCGA
2501	TTCGTGCTCT	TGGTTTACAG	GACGGCATGA	CGGTTTCCTT	CCATCACGCT
2551	TTCCGTGGCG	GTGACCTGAC	CGTCAATATG	GTGATGGACG	TCATCGCGAA
2601	GATGGGCTTT	AAAAACCTGA	CCCTGGCGTC	CAGTCCCTG	AGTGATTGCC
2651	ATGCGCCGCT	GGTAGAACAC	ATTGCGCCAGG	GCGTGGTTAC	CCGCATTTAT
2701	ACCTCCGGCC	TGCGTGGTCC	ACTGGCGGAA	GAGATCTCCC	GTGGTCTGCT
2751	GGCAGAACCG	GTGCAGATCC	ACTCTCACGG	CGGTCGTGTG	CATCTGGTAC
2801	AGAGCGGCGA	ACTGAATATC	GACGTGGCTT	TCCTCGGCGT	CCCGTCCGTG
2851	GATGAATTCG	GTAATGCCAA	CGGCTACACC	GGTAAAGCCT	GCTGCGGCTC
2901	CCTCGGCTAT	GCAATAGTTG	ATGCCGACAA	CGCAAACAG	GTCGTGATGC
2951	TTACCGAAGA	ACTGCTGCCT	TATCCGCATA	ATCCGGCAAG	CATTGAGCAA
3001	GATCAGGTTG	ATTTGATCGT	CAAAGTTGAC	CGCGTTGGCG	ATGCTGCAAA
3051	AATCGGCGCT	GGCGCGACCC	GTATGACCAC	TAACCCGCGC	GAAGTCTTA
3101	TTGCCCGTAG	CGCTGCGGAT	GTGATTGTCA	ACTCTGGCTA	CTTCAAAGAA
3151	GGTTTCTCCA	TGCAAACCGG	CACCGGCGGC	GCATCGCTGG	CGGTAACCCG
3201	TTTCTTGGA	GACAAAATGC	GTAGCCGCGA	TATTCGCGCC	GACTTCGCCC
3251	TTGGCGGTAT	TACCGCGACG	ATGGTTGACC	TGCACGAAAA	AGGTCTGATC
3301	CGCAAACCTG	TGGATGTGCA	GAGCTTTGAC	AGCCATGCTG	CGCAATCGCT
3351	GGCCCGTAAC	CCCAATCACA	TCGAAATCAG	CGCCAACCAAG	TACGTAACCT
3401	GGGGTTTCGAA	AGGCGCATCG	GTTGATCGTC	TCGACGTGGT	GGTACTGAGC
3451	GCGCTGGAAA	TTGACACCCA	GTTCAACGTT	AACGTGCTGA	CCGGCTCTGA
3501	CGGCGTACTG	CGTGGTGCTT	CCGGTGGTCA	CTGCGATACC	GCGATTGCCT
3551	CTGCGCTTTC	CATCATCGTC	GCGCCGCTGG	TACGCGGTCCG	TATTCCGACT
3601	CTGGTGGATA	ACGTACTGAC	CTGCATCACC	CCAGGCTCCA	GTGTGATAT
3651	TCTGGTCACA	GACCACGGTA	TCGCAGTTAA	CCCGGCACGT	CCGGAACCTGG
3701	CAGAACGTCT	GCAGGAAGCG	GGCATTAAG	TGGTTTCCAT	TGAGTGGCTG
3751	CGCGAACGTG	CGCGTCTGCT	GACCGGTGAA	CCACAGCCGA	TTGAATTCAC
3801	AGACCGCGTC	GTTGCCGTTG	TGCGTTACCG	CGATGGCTCG	GTGATCGATG
		Stop citF₁	Start citX		
3851	TTGTGCATCA	GGTGAAGGAA	TAAGCCATGC	ACCTGCTTCC	TGAAGTCCGC
3901	AGCCACCATG	CGGTATCAAT	TCCCGAGCTG	CTCGTCAGCC	GGGATGAAAG
3951	GCAAGCACGG	CAACACGTCT	GGCTCAAGCG	CCATCCTGTT	CCACTGGTCT
4001	CCTTTACCGT	GGTTGCGCCT	GGGCCGATTA	AAGACAGCGA	GGTCACACGC
4051	CGAATTTTTA	ATCATGGCGT	GACAGCCTTG	CGTGCCTTAG	CCGCAAAACA
4101	GGGCTGGCAA	ATTCAGGAGC	AGGCTGCACT	GGTTTCCGCC	AGCGGGCCGG
4151	AGGGCATGTT	GAGCATTGCC	GCCCCGGCTC	GCGACCTCAA	GCTCGCCACC
4201	ATTGAGCTTG	AACATAGTCA	TCCTCTCGGG	CGGTTATGGG	ATATCGATGT
4251	CCTGACGCCC	GAAGGCGAAA	TTCTCTCCCG	CCGCGACTAT	TCACTGCCGC
4301	CTCGCCGCTG	CCTGTTGTGC	GAACAAAGCG	CAGCCGTCTG	CGCGCGTGGA
4351	AAAACCCATC	AACTGACCGA	TTTACTCAAC	CGCATGGAGG	CACTGCTGAA
		Stop citX₁			

8

```

4401  CGATGTCGAT GCCTGCAACG TCAACTAAAA CCACAAAGCT TGCGACGTCA
      Lstart citG
4451  TTAATCGATG AGTACGCCCT GCTGGGCTGG CGCGCCATGC TGACTIONAAGT
4501  CAATCTGTCA CCGAAACCAG GCCTCGTGGA TCGCATTAACT TGCGGTGCGC
4551  ACAAAGATAT GCGCGCTGGAA GATTTCACC GCAGCGCGCT GCGGATTCAG
4601  GGCTGGCTAC CCCGTTTCAT TGAATTTGGT GCCTGTAGTG CGGAAATGGC
4651  ACCAGAAGCG GTACTCCACG GATTACGCC AATTGGTATG GCTTGCGAAG
4701  GTGATATGTT CCGCGCCACT GCGGGCGTAA ACACGCATAA AGGCAGCATT
4751  TTTTCTTTAG GGCTGCTATG TGCGGCAATT GGCCGTTTGC TTCAACTCAA
4801  CCAACCGGTA ACGCCAACAA CCGTTTGTTT TACGGCGGCA AGTTTCTGCC
4851  GTGGCCTGAC CGATCGCGAA CTGCGTACCA ATAATTCACA ACTGACGGCA
4901  GGTCAACGGT TGTACCAACA GCTTGGCCTT ACCGGCGCAC GCGGTGAAGC
4951  CGAAGCGGGT TATCCACTGG TGATCAATCA CGCCTTGCCG CATTACCTCA
5001  CTCTGCTGGA TCAGGGGTTA GATCCTGAAC TGGCATTGCT CGATACCTTG
5051  CTCCTACTGA TGGCGATCAA CGGCGATACC AACGTTGCAT CGCGCGGTGG
5101  CGAGGGGGGC CTGCGCTGGC TACAGCGCGA GCGCAAACA TTATTGCAAA
5151  AAGGGGGCAT TCGAACCCCC GCCGATCTCG ATTATCTCCG GCAGTTCGAC
5201  AGGGAGTGTA TCGAACGAAA TCTCAGTCCA GCGGCAGTG CTGACCTACT
      Stop citG
5251  GATCCTTACC TGGTTTTTAG CACAGATTTA ATTATTTAAG CACTTGATAA
      Start citT
5301  ATTTGGAAAT ATTAATTTTC GGAGAACCCG TATGTCTTTA GCAAAAGATA
5351  ATATATGGAA ACTATTGGCC CCACTGGTGG TGATGGGTGT CATGTTTCTT
5401  ATCCCTGTCC CCGACGGTAT GCCGCCGAG GCATGGCATT ACTTCGCTGT
5451  GTTTGTGGCA ATGATTGTCT GCATGATCCT CGAG

```

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 4:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 33 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'- AAATTTTCATATGCACCTGCTTCCTGAACTCGCC - 3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 5:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 36 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

5'- GGGCCCCCTCGAGTTAGTTGACGTTGCAGGCATCGAC - 3'

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 6:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 553 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

```
1  ATGCACCTGC TTCCTGAACT CGCCAGCCAC CATGCGGTAT CAATTCCCGA
51 GCTGCTCGTC AGCCGGGATG AAAGGCAAGC ACGGCAACAC GTCTGGCTCA
101 AGCGCCATCC TGTTCCACTG GTCTCCTTTA CCGTGGTTGC GCCTGGGCCG
151 ATTAAAGACA GCGAGGTCAC ACGCCGAATT TTTAATCATG GCGTGACAGC
201 CTTGCGTGCC TTAGCCGCAA AACAGGGCTG GCAAATTCAG GAGCAGGCTG
251 CACTGGTTTC CGCCAGCGGG CCGGAGGGCA TGTTGAGCAT TGCCGCCCCG
301 GCTCGCGACC TCAAGCTCGC CACCATTGAG CTTGAACATA GTCATCCTCT
351 CGGGCGGTTA TGGGATATCG ATGTCCTGAC GCCCGAAGGC GAAATTCTCT
401 CCCGCCGCGA CTATTCAGTG CCGCCTCGCC GCTGCCTGTT GTGCGAACAA
451 AGCGCAGCCG TCTGCGCGCG TGGAAAAACC CATCAACTGA CCGATTTACT
501 CAACCGCATG GAGGCACTGC TGAACGATGT CGATGCCTGC AACGTCAACT
551 AA
```

INFORMATION FOR SEQ ID NO. 7:

SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH : 5593 base pairs
- (B) TYPE : nucleic acid
- (C) STRANDNESS : single
- (D) TOPOLOGY : linear

```
1  TTAATTAACA ACATAAAAAC CATAAAGCCA ATTAAGCCAC GAGAAAAACT GTGACTTAAA
61 TACAAGAATC CATAGCCGAA CGCTGGCGAA ATACAGTTCG TTTTGAAATG ACGAAGCGCT
   rStart citCm
121 AAAAAATGAC ACTGATATTA AAACGCGTTC AGCTATTAAA AGATAAACCG CGGCGAGAGG
181 CGATCGATCG GTTTCTCCGC CAGCATCAAC TGTCGTTAGA GGCCGACTGC GAAATGGCGA
241 TTATCGCCGA GTATCAGCAG CGGCTGGTCG GCTGCGGTGC TATCGCCGGC AATGTGCTGA
301 AATGCATCGC CATCGATCCC TCGCTGCAGG GGGAGGGGCT GAGCCTTAAA TTACTGACCG
361 AGCTCCTGAC GCTGGCCTAT GAGCTGGGGC GCAGCGAACT GTTTTTGTTC ACTAAACCTT
421 GCAATGCCGC GTTATTTTCC GGCGCCGGCT TCTGGCCGAT AGCCCAGGCG GGCGACCGCG
481 CCGTGCTAAT GGAAATAGC CGCGAACGGC TGACTCGTTA CTGTCGACAG CTGGCGATGT
541 ACCGTCAGCC GGGAAGAAAA ATCGGCGCTA TCGTGATGAA TGCTAATCCA TTCACCCTCG
601 GCCACCGCTG GTTGGTAGAA CAGGCGGCCA GCCAGTGCGA CTGGCTGCAT CTGTTTGTGG
661 TCAAAGAAGA TGCGTCCTGC TTTTCCTATC ACGATCGCTT CAAGCTCATT GAACAGGGGA
721 TTACCGGCAT CGATAAGGTG ACGCTGCATC CCGGTTCCGG GTATCTGATC TCGCGGGCGA
781 CGTTCCTCCG CTATTTCTTG AAAGAGCAGG GGGTGGTTGA TGAAGTCCAC AGCCAGATTG
841 ACCTGCAGCT CTTCCGCGAG CGCCTGGCCC CGGCGCTGCA GATTACCCAT CGCTTTGTCT
901 GCACCGAGCC GCTGTGTCCC CTGACCCGTA ATTACAACCA GCGCATGAAG TCACTACTGG
961 AAGCGCCAGG CGACGCGCCG CCCATTGAAG TAGTTGAGCT TGCGCGAATC GAAAAAATG
1021 GTGGACCCGT GTCGGCCTCC CGAGTGCGCG AACTCTATCG ACAGCGCAAC TGGCAGGCGG
1081 TCGCGGCGCT GGTACCGCCG GGAACCCTCT CTTTCTTGAT GCAACTGGCG GAAAGCGAAC
   Stop citCj
1141 ATCAAACCGC CTGATTTATA CGCCCTAACT AAGGATTTTC CCCTATGGAA ATGAAGATTG
   rStart citD
```

10

1201 ACGCCCTGGC CGGCACGCTG GAGTCCAGCG ATGTGATGGT CAGGATTGGA CCCGCGGCGC
 1261 AGCCGGGCAT TCAGCTGGAA ATCGACAGCA TTGTGAAACA ACAGTTTGGC GCTGCGATTG
 1321 AGCAGGTAGT GAGAGAAACG CTGGCTCAGC TTGGCGTGAA ACAGGCCAAC GTGGTGGTCG
 1381 ATGATAAAGG CGCGCTGGAA TGTGTTTTGC GAGCTCGCGT ACAGGCCGCG GCGCTGCGCG

Stop citD₁

1441 CGGCGCAACA GACCCAATTA CAATGGAGCC AGCTATGAAA CCACGTCGCA GTATGTTGTT

Lstart cite

1501 CATCCCTGGC GCCAATGCCG CCATGTAAAG CACGTCATTC GTCTACGGCG CTGATGCTGT
 1561 GATGTTTCGAC CTGGAAGATG CCGTTTCGCT GCGCGAGAAA GATACCGCTC GTCTGCTGGT
 1621 GTATCAGGCG CTGCAGCATC CACTGTATCA GGATATCGAA ACCGTGGTGC GTATTAACCC
 1681 GCTAAATACC CCGTTTGGTC TGGCCGATCT GGAAGCCGTG GTTCGTGCGG GCGTGGATAT
 1741 GGTGCGTCTG CCGAAAACCG ACAGCAAAGA AGATATCCAT GAGCTGGAAG CGCATGTTGA
 1801 GCGGATTGAA CGCGAGTGCG GCCGGGAAGT GGGCAGCACC AAGTTAATGG CCGCGATCGA
 1861 GTCGGCGCTG GGCCTGGTGA ACGCGGTGGA AATCGCCCGC GCCAGCCCGC GTCTGGCGGC
 1921 GATCGCGCTG GCGGCCTTTC ATTACGTGAT GGATATGGGC ACCTCCCGCG GCGACGGTAC
 1981 TGAAGTGTTC TACGCCCGCT GCGCTGTACT GCATGCCGCC CGCGTTGCCG GCATCGCCGC
 2041 CTATGACGTG GTGTGGTCGG ATATCAATAA TGAAGAGGGC TTCCTGGCGG AAGCGAATCT
 2101 GGCCAAAAC CTCGGCTTTA ACGGCAAATC GTTGGTTAAC CCACGACAAA TTGAATCCT
 2161 GCATCAGGTC TATGCCCCGA CGCGCAAAGA GGTCGATCAC GCGCTGGAAG TGATTGCCGC
 2221 GCGGAAGAA GCCGAAACGC GAGGTCTGGG TGTGGTATCG CTGAACGGCA AGATGATCGA
 2281 TGGACCGATT ATCGACCATG CTCGCAAAGT GGTGGCGCTC TCGGCTTCCG GTATTCGTGA

Stop cite

rStart citF

2341 TTAAGGGGAA TAAGATGAAA GAGACAGTAG CAATGCTTAA TCAGCAGTAC GTGATGCCGA
 2401 ATGGACTGAC ACCTTATGCC GCGCTAACGG CGAAAAGTCC CTGGCTGGCG AGTGAGAGCG
 2461 AAAAGCGCCA GCGCAAATC TGCAGATTCG TGGAAACGGC AATCCGTCGC TCCGGCCTGC
 2521 AAAACGGCAT GACCATCTCG TTTACACAG CGTTTCGCGG CCGTGACAAA GTCGTCAATA
 2581 TGGTAGTGCG GAAGCTGGCG GAAATGGGTT TTCGCGATCT CACCCTGGCG TCCAGTTCGC
 2641 TGATCAGCGC CCACTGGCCG CTGATCGAGC ATATTAAAAA TGGCGTGATC CGCCAGATCT
 2701 ACACCTCCGG CCTGCGCGGC AAGTTGGGCG AGGAGATCTC CGCCGGTTTA ATGGAAAACC
 2761 CGGTGCAGAT CCACTCCAC GCGGTCGCG TACAGCTGAT TCAAAGCGGC GAGCTGTCGA
 2821 TTGATGTCGC GTTCTCGGC GTTCCTTGCT GCGATGAGTT TGGCAACGCC AACGGCTTTA
 2881 GCGGTAAATC ACGCTGCGGT TCTCTGGGCT ACGCGCGCGT CGATGCCGAG CACGCTAAAT
 2941 GCGTGGTGCT GCTCACCAGAA GAGTGGGTGG ATTATCCTAA CTATCCGGCC AGTATTGCC
 3001 AGGATCAGGT GGATCTGATA GTCCAGGTAG ATGAAGTCGG CGATCCGCAA AAAATTACCG
 3061 CGGGTGCCAT CCGTCTGACC AGCAACCCGC GCGAGCTGCT GATCGCCCGC CAGGCGGCGA
 3121 AAGTCGTTGA GCACTCCGGT TACTTTAAAG AGGGTTTCTC GCTGCAGACC GGTACCGGCG
 3181 GCGCCTCGCT GGCAGTAACT CGCTTCCTTG AAGATAAAAT GCGCCGTAAC GGCATTACCG
 3241 CCAGCTTCGG CCTCGGCGGT ATCACCAGGA CGATGGTTCGA TTTGCACGAA AAAGGGTTGA
 3301 TCAAAACGCT GCTCGATACC CAGTCCTTCG ATGGTGACGC GCGCGGTTTC CTGGCGCAGA
 3361 ACCCGAACCA TGTCGAGATC TCCACCAATC AGTATGCCAG CCCGGGCTCC AAAGGCGCCT
 3421 CCTGCGAGCG CTTAAACGTG GTGATGCTCA GCGCGCTGGA AATTGATATC GACTTTAACG
 3481 TTAACGTGAT GACCGGTTCT AACGGTGTGC TGC CGGGGCG GTCCGGTGGC CATAGCGATA
 3541 CCGCCGCGG TGCGGATTTG ACCATTATTA CCGCGCCGTT AGTTCGCGGC CGTATTCCCT
 3601 GCGTCGTGGA AAAGGTGCTG ACCCGCGTCA CGCCGGGGG CAGCGTGGAT GTGCTGGTCA
 3661 CTGACCACGG CATTGCGGTC AACCCGGCAC GTCAGGACCT GATCGACAAT TTGCGCAGCG
 3721 CAGGCATTCC GCTGATGACC ATTGAGGAAC TGCAGCAGCG TGCTGAGCTG TTGACTGGCA
 3781 AGCCGCAGCC GATCGAATTC ACCGATCGGG TGGTGGCGGT GGTGCGCTAT CGCGACGGTT

Stop

citF₁

rStart

3841 CGGTCATCGA TGTGATTCGT CAGGTGAAAA ACAGCGACTA AACGCAGAGG GGAAAGGCCA

citG

3901 TGAGCGACGT GTTAATTAAT CCTGCGCGTG TCGGCGCGCT GAAGCCACTG AGTGCCGAAG
 3961 AGGTGGTCAG CGCGGTAGAG CGCGCGCTGT TGACCGAAGT TCGCCTGACC CCAAAGCCCC

4021 GGTGTTGGTGA TATTCGTAAC GCTGGCGCGC ACTGGGATAT GGATCTGGCC TCGTTTGAGG
4081 CCAGCACCGC GGTGGTGGCT CCGTGGATGG AGAAATTTT CATCATGGGC CACGATACTG
4141 CGGCGGTTCG GCCGGAGCAG GTATTGATGA TGCTGCGCCC GGTAGGGATG GCCTGTGAGA
4201 ACGATATGCT GGAGGCCACC GGCGGGGTGA ATACCCATCG CGGGGCGATC TTCGCTTTTG
4261 GCCTGCTCAG CGCGGCGGCG GGCAGGCTGG TGTCGAAAGG TGAGCCGATA GAGCAGCACC
4321 GGCTTTGCGA CCAGGTGGCG CGCTTCTGTC GCGGCATGGT TATGCAGGAG TTGTCTTCTG
4381 CTGGCGGGGA ACGGCTCAGT AAAGGCGAGG CTCATTTTCT ACGCTATGGT CTCTCCGGGG
4441 CCCGCGGCGA GGCAGGAGAG GGTTCCTGA CCGTGCGTAC CCAGGCCATG CCAGTCTTTA
4501 CCCGCATGAT GGAAGAGACC GGCAGACAGTA ATCTGGCGCT ACTGCAAACC CTGCTGCATC
4561 TGATGGCGTG GAATGATGAC ACCAACCTGG TCTCGCGCGG CGGGCTTGCC GGGCTGAAC
4621 TTGTCCAGCA GGAGGCGCAG CGACTGCTGT GGCAGGGCGG CGTGCTGGCG GACGGCGGGC
4681 TGGAGGCGCT GCGACAGTTT GACGATGAGC TGATTGCCCG CCATCTCAGC CCTGGCGGCA
4741 GCGCCGATCT GTTGGCGGTG ACCTGGTTTT TATCCGCGTT TCCCGCCGGC GCGCTTTTCC
Stop citG
4801 CGCTGTAACC CACTGCAATA CCGCCTTCGC CCGCACTGTA CGGGCGAGGG CGCCATCATT
4861 AGCCTTCCCG GTTGTTCATCC GGTAACACG GAATCGCGGC ACAATCGTAT AGTTTTTACT
4921 GATATCGTCC GCCGTTTGTC ATAAATTTCT AATTATCGGC GTTTTTGAGT AGCGGCCCGC
4981 TGACGGGCTG GTTACTCTGA AAACAATTTA CGTAATGTTA ACAAAGAGA ATAGCTATGC
5041 ATGATGCACA AATCCGCGTG GCCATCGCCG GCGCGGGCGG CCGGATGGGA CGCCAGTTAA
5101 TTCAGGCTGC ATTGCAGATG GAAGGCGTGG CGCTGGGCGC GCGCTGGAG CGCGAAGGGT
5161 CAAGCCTGGT GGGCAGCGAC GCCGGCGAGC TGGCGGGCGC CGGCAAAGCG GCGTCGCGG
5221 TGCAGAGCAG CCTGGCGGCG GTAAAAGATG ATTTTCGACGT GTTGATCGAT TTTACCCGCC
5281 CGGAAGGCAC GCTGAACCAT CTGGCGTTTT GCGCGAGCA CGGCAAAGGG ATGGTCATCG
5341 GCACCACCGG TTTTGACGAC GCTGGCAAAC AGGCGATTCT CGATGCCGCG CAGGACATTG
5401 CCATTGTCTT CGCCGCTAAC TTTAGCGTTG GCGTCAATGT CCTGTTGAAG CTGCTGGAGA
5461 AGGCGGCGAA GGTGATGGGC GACTATACCG ACATCGAAAT TATCGAAGCG CACCACCGGC
5521 ATAAAGTGGA TGCGCCGTCA GGCACGCGC TGGCGATGGG CGAAGCGATC GCCGGGGCAT
5581 TGAACAAAGA TCT

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1:

Kultivierung der Zellen

Es wurden folgende Stämme und Plasmide verwendet: E. coli DH5α bzw. BL21 (DE3) (F.W. Studier und B.A. Mofatt, J. Mol. Biol. Vol. 189, 113-130 (1986)) und pACYC184 (A.C.Y. Chang et al., J. Bacteriol. Vol. 134, 1141-1156 (1978)). Die E. coli-Zellen wurden routinemäßig in Luria-Bertani (LB)-Medium bei 37°C nach J. Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2nd Edition 1989) kultiviert. Es wurden Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen dazugegeben: Amphotillin 200 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml. Der Stamm E. coli DH5α wurde als Wirtsorganismus für die Klonierung verwendet. Die E. coli BL21 (DE3) –Zellen, welche das Phagen T7-Polymerasegen unter Kontrolle eines lacUV5-Promotors enthalten (F.W. Studier und B.A. Mofatt, supra) diente als Wirt für die Expression der Zielgene von pT7-7- und

pET-Derivaten. Die Kulturen für die Expression wurden wie folgt hergestellt: Nach Zentrifugation (3000 g, 8 Min.) einer Vorkultur von 40 ml, die über Nacht bei 37°C inkubiert worden war, wurden die Zellen in 20 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zum Animpfen von 2 L desselben Mediums, welches entsprechende Antibiotika enthält, verwendet und die Kultur wurde bei 37°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert. Bei Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes zwischen 0,5 und 0,8 wurde die Expression der Zielgene durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Kultur für weitere 3 Stunden bei 37°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 Min. bei 3000 g) geerntet, einmal mit 20 ml 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 1 mM MgCl₂ gewaschen und bei -20°C gelagert.

Beispiel 2:

Isolierung der Gene und Gencluster

Für die Konstruktion des Expressionsplasmides, das den E. coli citCDEFXG-Gencluster enthält, wurde ein 6,9 kb großes Fragment aus der chromosomalen DNA von E. coli via PCR mit den Primern eccl-for (s. SEQ ID NO. 1) und ec-citT-rev (SEQ ID NO. 2) unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems von Roche Diagnostics amplifiziert. Das 6.9 kb PCR-Fragment, das zusätzlich das citT-Gen enthält (K.M. Pos et al., J. Bacteriol. Vol. 180, 4160-4165 (1998)), wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und XhoI geschnitten und das resultierende 5.5 kb Fragment (SEQ ID NO. 3) und ein ebenfalls entsprechend linearisierten Expressionsvektor, wie z.B. pKK177-3Hb, pKKT5, pUC18, pT7, pET24b auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden isoliert (QIAEX-Kit der Firma Diagen). Anschließend wurden das PCR-Fragment und das Vektorfragment mittels T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Dazu wurden 1 µl (20ng) Vektorfragment und 3 µl (100 ng) PCR-Fragment, 1 µl 10x Ligase-Puffer (Maniatis et al., 1989 B.27), 1 µl T4-DNA-Ligase, 4 µl steriles H₂O bidest. pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Das aus der PCR erhaltene Insert startet 55 bp vor dem citC-Startcodon und endet 203 bp downstream vom citG-Stopcodon.

Für die Konstruktion des Expressionsplasmides, das das citX-Gen aus E. coli enthält (SEQ ID NO. 3), wurde das citX-Gen via PCR aus der chromosomalen DNA mit den Primern ec-citX-for (SEQ ID NO. 4) und ec-citX-rev (SEQ ID NO. 5) unter Verwendung der Pfu DNA Polymerase (Stratagene) amplifiziert. Das Startcodon ist Teil einer NdeI-Restriktionsendonukleaseschnittstelle und direkt hinter dem Stopcodon befindet sich eine XhoI-Restriktionsendonukleaseschnittstelle. Nach Verdau des PCR-Produktes mit NdeI und XhoI wurde das resultierende 555

bp DNA-Fragment (SEQ ID NO. 6) in entsprechend linearisierte Expressionsvektoren ligiert (wie oben beschrieben).

Die Konstruktion des Expressionsplasmides, das den citCDEFG-Gencluster von *Klebsiella pneumoniae* enthält, ist in M. Bott und P. Dimroth, *Molecular Microbiology* Vol. 14 (2), 347-356 (1994) beschrieben. Die Sequenz des citCDEFG-Genclusters ist in SEQ ID NO. 7 wiedergegeben.

Beispiel 3:

Transformation der unterschiedlichen Expressionsplasmide in verschiedene E. coli Expressionsstämme

Kompetente Zellen verschiedener E. coli-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (*J. Mol. Biol.* Vol. 166, 557 ff. (1983)) hergestellt. 200 µl derart hergestellter Zellen wurden mit 20 ng isolierten der entsprechenden Expressionsplasmide versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (90 Sek. bei 42°C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium überführt und zur phänotypischen Expression 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Aliquote dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Beispiel 4:

Expression der verschiedenen Zielgene

Nach Zentrifugation (3000 g, 8 Min.) von 40 ml Vorkultur, die über Nacht bei 37°C gewachsen worden war, wurden das Zellpellet in 20 ml frischen LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin verwendet, um 2 l LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika anzupflanzen. Diese Zellkultur wurde bei 37°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert. Bei einer optischen Dichte (gemessen bei 600 nm) von 0,5 - 0,8 wurde die Expression der Zielgene durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG, Endkonzentration) induziert und die Kulturen 3 Stunden bei 37°C und 180 rpm weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (30 Min. bei 3000 g) einmal in 20 ml 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Zur Zellextraktpräparation wurden 1 g Zellen (Naßgewicht) in 4 ml kaltem 50 mM Kaliumphosphat, 1 mM MgCl₂ pH 7,0 resuspendiert. Nach Zugabe des Proteaseinhibitor-Cocktails (Roche Diagnostics) und DNaseI bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/ml wurden die

Zellen durch eine dreimalige Passage in der French Press bei 108 Mpa aufgeschlossen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 Min. bei 27000 g) entfernt. Der zellfreie Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (1h bei 150000 g) von der Membranfraktion getrennt und der daraus resultierende Zellextrakt kann direkt für enzymatische Studien und zur Proteinreinigung verwendet werden.

Beispiel 5:

Citratlyase-Aktivitätstest

Die Citratlyase-Aktivität wurde bei 25°C in einem spektrophotometrischen Test gekoppelt mit Malatdehydrogenase von Roche Diagnostics durchgeführt. Die Testmischung enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 50 mM Glycylglycin pH 7,9, 5 mM Kaliumcitrat, 2 mM ZnCl_2 , 0,5 mM NADH, 30 U Malatdehydrogenase (Roche Diagnostics) und 10 μl bzw. 20 μl Zellextrakt. Die Oxidation von NADH wurde im Spektrophotometer bei 365 nm gemessen ($\epsilon = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Eine Enzymeinheit (Unit) ist definiert als 1 μmol Citrat, welches pro Minute zu Acetat und Oxalacetat abgebaut wird.

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Verfahren zur rekombinanten Herstellung von
Holo-Citratlyase

<130> 523400EP

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 1

ccctctagag aacaacattc gttgcaaadc gataac

36

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 2

ccgcgaattc ttagttccac atggcgagaa tcggccag

38

<210> 3

<211> 5484

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 3

gaacaacatt	cgttgcaaat	cgataacaac	atgcaccttc	aggatactat	ttattatggt	60
cggcaatgat	atcttcaccc	gcgtaaaacg	ttcagaaaaat	aaaaaatgg	cggaaatcgc	120
ccaattcctg	catgaaaatg	atttgagcgt	tgacaccaca	gtcgaagtat	ttattaccgt	180
aaccgcgcgt	gaaaagctta	tcgcgtgcgg	tggaattgcc	ggaaatatta	ttaaatgcgt	240
tgctatcagt	gaatccgtcc	gcggtgaagg	actggcgctg	acattagcca	ctgaattgat	300
aaacctcgcc	tatgagcggc	acagcacgca	tctgtttatt	tataccaaaa	ccgaatacga	360
ggcgctgttc	cgccagtgcg	gtttttccac	gctgaccagc	gtacccggcg	tgatgggtgct	420
gatggaaaac	agcgccacgc	gactgaaacg	ctatgccgaa	tcgctgaaaa	aatttcgtca	480
tccagggaac	aagattggct	gcattgtgat	gaacgccaat	ccctttacga	atggtcaccg	540
ttatctgatt	caacaggctg	cggcacagtg	cgactggttg	catctgtttt	tagtcaaaga	600
agattcttca	cgcttccctt	atgaagaccg	gctggatttg	gtgttaaaaag	gcaccgcccga	660
tattccacgc	ctgactgtgc	atcgtggctc	cgaatacatc	atctcccgcg	ctacgttccc	720
ttgctacttc	attaaagaac	agagcgtcat	taaccattgt	tacaccgaaa	ttgatctgaa	780
gattttccgt	cagtacctcg	ctcccgcgct	gggtgttaact	caccgctttg	tcggtactga	840
acccttttgt	cgcggtaccg	cccagtaaca	ccaggatatg	cgctactggc	tggaaacgcc	900
gactatctcc	gcaccgccc	tcgaactggt	tgaaattgag	cggctgcgtt	accaggagat	960
gccgatatac	gcttcccggg	tacgtcaact	gctggcgaaa	aacgatctca	cggctatcgc	1020
gccgctggtc	cctgcagtca	cgctgcatta	tttgagaaac	ctgcttgagc	actcccgcga	1080
ggacgcggca	gctcgtcaaa	agacccccgc	atgagaaaca	ggtgaaaaat	gaaaataaac	1140
cagcccgcgc	ttgcaggcac	ccttgagtct	ggggatgtga	tgatacgcac	cgccccactc	1200
gatacgcagg	atatcgacct	gcaaatcaat	agcagcgttg	agaaacagtt	tggcgatgca	1260

THIS PAGE BLANK (USPTO)

attcgcacca ccattctgga cgttctcgcc cgctacaacg tgcgcggcgt acagctgaat 1320
gtc gatgaca aaggcgcaact ggactgcatt ttacgtgcac gactggaagc cctgctggca 1380
cgccagcg gtatcccggc tctgccatgg gaggattgcc aatgatttcc gcttcgctgc 1440
aacaacgtaa aactcgcaac cgccgcagca tgttggttgc gcttggtgcc aatgccgcga 1500
tggtcagcaa ctccctcatc taccggctg atgccctgat gtttgacctc gaagactccg 1560
tagcattgcg tga aaaagac accgcccgcg gcatggttta ccacgcgctg caacatccgc 1620
tgtatcgcg tattgaaacc attgtgcgtg tcaacgcgct ggattccgaa tgggggtgta 1680
acgacctgga agccgtcggt cgcggtgggt cggacgttgt gcgtctgccg aaaaccgata 1740
ccgctcagga tgttctggat attgaaaaag agatcctgcg tatcgaaaaa gcctgtggtc 1800
gtgaaccgg cagcaccggc ctgctggcgg cgattgaatc tccgctgggg attaccgcg 1860
cagtggaat cgctcacgct tccgagcggt tgatcggtat cgccctcggt gcagaagact 1920
atgtgcgcaa cctgcgtaca gaacgctccc cggaaggaaac tgaactgctg ttcgcacgct 1980
gttccatttt gcaggccggc cgctctgcgg gtattcaggc gttcgatacc gtctattccg 2040
acgctaaca cgaagccgga tttctgcaag aagccgcca catcaaacag ctgggctttg 2100
aggcaaatc gctgatcaac ccgctcaga ttgatctgct gcacaacctc tacgcaccga 2160
cccagaaaga agtggatcac gcccgccggc tcgtagaagc cgctgaagcc gccgctcgcg 2220
aaggcctcg cgtggtttcc ctgaacggca agatggtgga cggtcgggtt atcgatcgcg 2280
cccgtctggt gctctcccgt gcagaacttt ccggcatccg cgaagaataa ggcaatcaaa 2340
atgacgcaga aaattgaaca atctcaacga caagaacggg tagcggcctg gaatcgctgc 2400
gctgaatgcg atcttgccgc tttccagaac tcgccaagc aaacctacca ggctgaaaaa 2460
gcgcgcgatc gaaactgtg cgccaacctg gaagaagcga ttcgtcgctc tggtttacag 2520
gacggcatga cggtttcctt ccatacgcgt ttccgtggcg gtgacctgac cgtcaatatg 2580
agtgatggc tcatcgcgaa gatgggcttt aaaaacctga cctggcgctc cagctccctg 2640
acctccggcc tgcgtggtcc actggcgga gagatctccc gtggtctgct cgcatttat 2700
gtgcagatcc actctcacgg cggctcgtgt catctggtac agagcggcga actgaatatc 2760
gacgtggctt tccctcggtt cccgtcctgt gatgaattcg gtaatgccaa cggctacacc 2820
ggtaaagcct gctgcggctc cctcggtat gcaatagttg atgccgacaa cgaaaacag 2880
gtcgtgatgc ttaccgaaga actgctgcct tatccgcata atccggcaag cattgagcaa 3000
gatcaggttg atttgatcgt caaagttgac cgcgttggcg atgctgcaaa aatcggcgct 3060
ggcgcgaccc gtatgaccac taaccgcgc gaactgctta ttgcccgtag cgtcgcgat 3120
gtgattgtca actctggcta cttcaaagaa ggtttctcca tgcaaacgg caccggcgcg 3180
gcatcgctgc cggtaaccgg tttcctggaa gacaaaatgc gtagccgcga tattcgcgcc 3240
gacttcgccc ttggcggtat taccgcgacg atggttgacc tgcacgaaaa aggtctgac 3300
cgcaaaactg tggtatgtca gagctttgac agccatgctg cgcaatcgct ggcccgtaac 3360
cccaatcaca tcgaaatcag cgccaaccag tacgctaact ggggttcgaa aggcgcacg 3420
gttgatcgtc tcgacgtggg ggtactgagc gcgctggaaa ttgacacca gttcaacgtt 3480
aacgtgctga ccggtctgta cggcgtactg cgtggtgctt ccggtggtca ctgcgatacc 3540
gcgattgcct ctgcgctttc catcatcgct gcgcgctgg tacgcggtcg tattccgact 3600
ctggtggata acgtactgac ctgcatcacc ccaggctcca gtgtcgatat tctggtcaca 3660
gaccacggtg tcgcagttaa cccggcacgt ccggaactgg cagaacgtct gcaggagcg 3720
ggcattaaag ttggttccat tgagtggctg cgcgaacgtg cgcgtctgct gaccggtgaa 3780
ccacagccga ttgaattcac agaccgcgtc gttgcggtg tgcgttaccg cgtgggtcg 3840
gtgatcgatg ttgtgcatca ggtgaaggaa taagccatgc acctgcttcc tgaactcgcc 3900
agccaccatg cggatatcaat tcccgaactg ctgctcagcc gggatgaaag gcaagcacgg 3960
caacacgtct ggctcaagcg ccactcgtgt ccactggtct cctttaccgt ggttgcgcc 4020
gggcccatta aagacagcga ggtcacacgc cgaattttta atcatggcgt gacagccttg 4080
cgtgccttag ccgcaaaaca gggctggcaa attcaggagc aggtgcact ggtttccgcc 4140
agcgggcccgg agggcatgtt gagcattgcc gcccggtct gcgacctcaa gctcgccacc 4200
attgagcttg aacatagtca tctctcggg cggttatggg atatcgatgt cctgacggcc 4260
gaaggcgaaa ttctctcccg ccgcgactat tcaactgccg ctgcgcgtg cctgttggtc 4320
gaacaaagcg cagcgtctg cgcgctgga aaaacccatc aactgaccga tttactcaac 4380
cgcatggagg cactgctgaa cgatgtcgat gctgcaacg tcaactaaaa ccacaaagct 4440
tgcgacgtca ttaatcgatg agtacgcctt gctgggctgg cgcgccatgc tgactgaagt 4500
caatctgtca ccgaaaccag gcctcgtgga tcgcataac tgcggtgcgc acaaagatat 4560
ggcgtggaa gatttccacc gcagcgcgt ggcgattcag ggctggctac cccgtttcat 4620
tgaatttggt gcctgtagtg cggaaatggc accagaagcg gtactccacg gattacggcc 4680
aattggatg gcttgcgaaag gtgatatgt ccgcgccact gcgggcgtaa acacgcataa 4740
aggcagcatt ttttctttag ggctgctatg tgcggcaatt ggccgtttgc ttcaactcaa 4800

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17

```

ccaaccggta acgccaacaa ccgtttgttc tacggcggca agttttctgcc gtggcctgac 4860
cgatcgcgaa ctgcgtagca ataattcaca actgacggca ggtcaacggt tgtaccaaca 4920
gcttggcctt accggcgcac gcggtgaagc cgaagcgggt tatccactgg tgatcaatca 4980
cgcccttgccg cattacctca ctctgctgga tcaggggtta gatcctgaac tggcattgct 5040
cgataccttg ctccactga tggcgatcaa cgcgcatacc aacgttgcat cgcgcggtgg 5100
cgagggggggc ctgcgctggc tacagcgcga ggcgcaaaac ttattgcaaa aagggggcat 5160
tcgaaccccc gccgatctcg attatctccg gcagttcgac agggagtgtg tcgaacgaaa 5220
tctcagtcca ggcggcagtg ctgacctact gatccttacc tggtttttag cacagattta 5280
attattttaag cacttgataa atttggaaat attaattttc ggagaacccg tatgtcttta 5340
gcaaaagata atatatggaa actattggcc ccactgggtg tgatgggtgt catgtttctt 5400
atccctgtcc ccgacggtat gccgcgcgag gcatggcatt acttcgctgt gtttgtggca 5460
atgattgtcg gcatgatcct cgag 5484

```

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> E. coli

<400> 4
 aaatttcata tgcacctgct tccatgaactc gcc 33

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> E. coli

<400> 5
 gggccctctg agttagttga cgttgcaggc atcgac 36

<210> 6
 <211> 552
 <212> DNA
 <213> E. coli

<400> 6
 atgcacctgc ttccatgaact cgccagccac catgcggtat caattcccga gctgctcgtc 60
 agccgggatg aaaggcaagc acggcaacac gtctgggtca agcggccatcc tgttccactg 120
 gtctccttta ccgtgggttg gcctgggccc attaaagaca gcgaggtcac acgccgaatt 180
 ttaaatcatg gcgtgacagc cttgctgtgc ttagccgcaa aacagggtcg gcaaatcag 240
 gagcaggctg cactggtttc cgccagcggg ccggagggca tgttgagcat tgccgccccg 300
 gctcgcgacc tcaagctcgc caccattgag cttgaacata gtcacccctc cgggcgggta 360
 tgggatatcg atgtccctgac gcccgaaagg gaaattctct cccgcgcgca ctattcactg 420
 ccgcctcgcc gctgcctgtt gtgcgaacaa agcgcagccg tctgcgcgcg tggaaaaacc 480
 catcaactga ccgatttact caaccgcatg gaggcactgc tgaacgatgt cgatgcctgc 540
 aacgtcaact aa 552

<210> 7
 <211> 5593
 <212> DNA
 <213> Klebsiella pneumoniae

<400> 7
 ttaattaaca acataaaaac cataaagcca attaagccac gagaaaaact gtgacttaaa 60
 tacaagaatc catagccgaa cgctggcgaa atacagttcg ttttgaaatg acgaagcgtc 120
 aaaaaatgac actgatatta aaacgcgttc agctattaaa agataaaccg cggcgagagg 180
 cgatcgatcg gtttctccgc cagcatcaac tgctcgttaga ggccgactgc gaaatggcga 240
 ttatcgccga gtatcagcag cggctgggtcg gctgcggtgc tatcgccggc aatgtgctga 300
 aatgcacgc catcgatccc tcgctgcagg gggaggggct gagccttaaa ttactgaccg 360
 agctcctgac gctggcctat gagctggggc gcagcgaact gttttgttc actaaacctt 420

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gcaatgccgc gttattttcc ggcgccggct tctggccgat agcccaggcg ggcgaccgcg 480
ccgtgctaata ggaaatagc cgcgaacggc tgactcgta ctgtcgacag ctggcgatgt 540
accgtcagcc gggaagaaaa atcggcgcta tegtgtgaa tgctaatacca ttcacctcg 600
gccaccgtg gttggtagaa caggcgcca gccagtgcga ctggctgcat ctgtttgtgg 660
tcaaagaaga tgcgtcctgc ttttccatc acgatcgctt caagctcatt gaacagggga 720
ttaccggcat cgataagggt acgtgcatc ccggttcggc gtatctgatc tcgcgggcga 780
cgttccccgg ctatttctcg aaagagcagg ggggtggtga tgactgccac agccagattg 840
acctgcagct cttccgcgag cgcctggccc cggcgctgca gattacccat cgctttgtcg 900
gcaccgagcc gctgtgtccc ctgaccgcta attacaacca gcgcatgaag tcaactactg 960
aagcgccagg cgacgcgccg cccattgaag tagttgagct tgcgcgaatc gaaaaaatg 1020
gtggaccgct gtcggcctcc cgagtgcgcg aactctatcg acagcgcaac tggcaggcgg 1080
tcgcgggcgt ggtaccgccg ggaacctct cttttctgat gcaactggcg gaaagcgaac 1140
atcaaaccgc ctgatttata cgcctaact aaggattttc ccctatggaa atgaagattg 1200
acgccctggc cggcacgctg gagtccagc atgtgatgt caggattgga cccgcggcgc 1260
agccgggcat tcagctggaa atcgacagca ttgtgaaaca acagtttggc gctgcgattg 1320
agcaggtagt gagagaaacg ctggctcagc ttggcgtgaa acaggccaac gtggtggtcg 1380
atgataaagg cgcgctggaa tgtgttttgc gagctcgct acaggccgcg gcgctgcgcg 1440
cggcgcaaca gacccaatta caatggagcc agctatgaaa ccacgtcgca gtatgttgtt 1500
catccctggc gccaatgccg ccatgttaag cacgtcattc gtctacggcg ctgatgctgt 1560
gatgttcgac ctggaagatg ccgtttcgt ggcgcgaaaa gataccgctc gtctgctggt 1620
gtatcaggcg ctgcagcatc cactgtatca ggatatcgaa accgtggtgc gtattaaccc 1680
gctaaatacc ccgtttggtc tggccgatct ggaagccgtg gttcgtgcgg gcgtggatat 1740
ggtgcgtctg ccgaaaaccg acagcaaaga agatatccat gagctggaag cgcattgtga 1800
gcggattgaa cgcgagtgcg gccgggaagt gggcagcacc aagttaatgg cggcgatcga 1860
gtcggcgctg ggcgtgtgga acgcggtgga aatcgccgc gccagcccgc gtctggcggc 1920
gatcgcgctg gcggccttcg attacgtgat ggatatgggc acctcccgcg gcgacggtag 1980
tgaactgttc tacgcccgtc gcgctgtact gcatgccgc cgcgttgcg gcacgcgcgc 2040
ctatgacgtg gtgtggtcgg atatcaataa tgaagagggc ttcctggcg aagcgaatct 2100
ggccaaaaac ctcggttcta acggcaaata gttggttaac ccacgacaaa ttgaactcct 2160
gcatcaggtc tatgccccga cgcgcaaaga ggtcgatcac gcgctggaag tgattgccgc 2220
ggcggaagaa gccgaaacgc gaggtctggg tgtggtatcg ctgaacggca agatgatcga 2280
tggaccgatt atcgaccatg ctcgcaaagt ggtggcgctc tcggcttccg gtattcgtga 2340
ttaaggggaa taagatgaaa gagacagtag caatgcttaa tcagcagtag gtgatgccga 2400
atggactgac accttatgcc ggcgtaacgg cgaaaagtc ctggctggcg agtgagagcg 2460
aaaagcgcca gcgcaaaatc tgcgattcgc tggaaacggc aatccgtcgc tccggcctgc 2520
aaaacggcat gacctctcg tttcaccacg cgtttcgcgg cggtgacaaa gtcgtcaata 2580
tggtagtggc gaagctggcg gaaatgggtt ttcgcgatct caccctggcg tccagttcgc 2640
tgatcgacgc ccactggccg ctgatcgagc atattaaaaa tggcggtgatc cgccagatct 2700
acacctccgg cctgcgcggc aagttgggcg aggagatctc cgccggttta atggaaaacc 2760
cgggtgcagat ccactcccac ggcggtcgcg tacagctgat tcaaagcggc gagctgtcga 2820
ttgatgtcgc gtttctcggc gttccttgcg gcgatgagtt tggcaacgcc aacggcttta 2880
gcggtaaatc acgctgcggt tctctgggct acgcgcgct cgatgccgag cagcgtaaat 2940
gcgtggtgct gctcaccgaa gagtgggtgg attatcctaa ctatccggcc agtattgcc 3000
aggatcagggt ggtatctgata gtccaggtag atgaagtcgg cgatccgcaa aaaattaccg 3060
cgggtgccat ccgtctgacc agcaaccgcg gcgagctgct gatcgcccgc caggcggcga 3120
aagtcggtga gcaactccgt tactttaaag agggtttctc gctgcagacc ggtaccggcg 3180
gcgcctcgt ggcagtaact cgcttccttg aagataaaat gcgcccgaac ggcattaccg 3240
ccagcttcgg cctcggcggt atcaccggga cgatggctga tttgcacgaa aaaggggtga 3300
tcaaaacgct gctcgatacc cagtccttcg atggtgacgc ggcgcgcttc ctggcgaga 3360
accggaacca tgtcgagatc tccaccaatc agtatgccag cccgggctcc aaaggcgctc 3420
cctgcgagcg cttaaacgtg gtgatgctca gcgcgctgga aattgatata gactttaacg 3480
ttaacgtgat gaccggttct aacgggtgac tgcgcggggc gtccggtggc catagcgata 3540
ccgcccgcgg tgcggtttg accattatta ccgcgcgctt agttcgcggc cgtattccct 3600
gcgtcgtgga aaaggtgctg acccgctca cgccgggggc cagcgtggat gtgctggtca 3660
ctgaccacgg cattgcggtc aaccggcac gtcaggacct gatcgacaat ttgcgcagcg 3720
caggcattcc gctgatgacc attgaggaa tgcagcagcg tgctgagctg ttgactggca 3780
agccgcagcc gatcgaattc accgatcggg tgggtggcggt ggtgcgctat cgcgacggtt 3840
cggtcacga tgtgattcgt caggtgaaaa acagcgacta aacgcagagg ggaaaggcca 3900
tgagcgacgt gttaattaat cctgcgcgtg tgcggcgctg gaagccactg agtgccgaag 3960

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19

aggtggtcag	cgcggtagag	cgcgcgctgt	tgaccgaagt	tcgcctgacc	ccaaagcccg	4020
ggttggtgga	tattcgtaac	gctggcgcg	actgggatat	ggatctggcc	tcgtttgagg	4080
ccagcaccgc	ggtggtggct	ccgtggatgg	agaaatTTTT	catcatgggc	cacgatactg	4140
cgcggtcgc	gccggagcag	gtattgatga	tgctgcgccc	ggtagggatg	gcctgtgaga	4200
acgatatgct	ggaggccacc	ggcggggtga	atacccatcg	cggggcgatc	ttcgcttttg	4260
gcctgctcag	cgcggcggcg	ggcaggctgg	tgctgaaagg	tgagccgata	gagcagcacc	4320
ggctttgcca	ccaggtggcg	cgcttctgtc	gcggcatggg	tatgcaggag	ttgtcttctg	4380
ctggcgggga	acggctcagt	aaaggcgagg	ctcattttct	acgctatggg	ctctccgggg	4440
cccgcggcga	ggcgagagag	ggtttcctga	cggtgcgtac	ccaggccatg	ccagtcttta	4500
cccgcgatgat	ggaagagacc	ggcgacagta	atctggcgct	actgcaaacc	ctgctgcac	4560
tgatggcggtg	gaatgatgac	accaacctgg	tctcgcgcg	cgggcttgcc	gggctgaact	4620
ttgtccagca	ggaggcgag	cgactgctgt	ggcagggcg	cgtgctggcg	gacggcgggc	4680
tggaggcgct	gcgacagttt	gacgatgagc	tgattgccc	ccatctcagc	cctggcgcca	4740
cgctgtaacc	gttggcggtg	acctggtttt	tatccgcgtt	tcccgcgggc	gcgcttttcc	4800
agccttccc	cactgcaata	ccgccttcgc	ccgcactgta	cgggcgaggg	cgccatcatt	4860
gatatcgctcc	gttgtcatcc	ggtaaaccag	gaatcgcggc	acaatcgat	agtttttact	4920
tgacgggctg	gccgtttgtc	ataaatttct	aattatcggc	gtttttgagt	agcggcccgc	4980
atgatgcaca	gttactctga	aaacaattta	cgtaatgtta	acaaaagaga	atagctatgc	5040
ttcaggctgc	aatccgcgtg	gccatcgccg	gcgcgggcgg	ccgatggga	cgccagttaa	5100
caagcctggg	attgcagatg	gaaggcgtgg	cgctgggcgc	ggcgctggag	cgcgaaaggt	5160
tgagagcag	gggcagcgac	gccggcgagc	tggcgggcg	cggcaaagcg	ggcgctcgcg	5220
cggaaggcac	cctggcgggc	gtaaaagatg	atttcgacgt	gttgatcgat	tttaccgcc	5280
gcaccaccgg	gctgaaccat	ctggcgtttt	gccgcgagca	cggcaaaggg	atggtcatcg	5340
ccattgtctt	ttttgacgac	gctggcaaac	aggcgattcg	cgatgccgcg	caggacattg	5400
aggcgggcga	cgccgctaac	tttagcgttg	gcgtcaatgt	cctgttgaag	ctgctggaga	5460
ataaagtgga	ggtgatgggc	gactataccg	acatcgaaat	tatcgaagcg	caccaccggc	5520
tgaacaaaga	tgcccggtca	ggcaccgcgc	tggcgatggg	cgaagcgatc	gccggggcat	5580
	tct					5593

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30. Sep. 1999

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit Citratlyase-Aktivität indem ein geeignetes Plasmid in einem Wirtsorganismus exprimiert wird und das Protein in aktiver Form isoliert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid die Information von einem aus mindestens sechs Genen bestehenden Gencluster sowie einen induzierbaren Promotor aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für bestimmte Untereinheiten des Proteins mit Citratlyase-Aktivität und/oder für an der Biosynthese des vollständigen Enzyms beteiligte Komponenten kodiert.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid die Gene citC, citD, citE, citF, citG und ein aus E. coli erhältliches DNA-Fragment, welches zwischen citF und citG auf dem E. coli Citratlyase-Gencluster lokalisiert ist, enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment für ein 20 kDA großes Protein kodiert.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment für ein das Motif G(A)-R-L-X-D-L(I)-D-V enthaltendes Protein kodiert.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Gen aus E. coli, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae oder Leuconostoc mesenteroides erhältlich ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens vier Gene aus dem Mikroorganismus stammen, der für das isolierte Protein mit Citratlyase-Aktivität spezifisch ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Klebsiella pneumoniae handelt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirtsorganismus um einen eukaryontischen oder prokaryontischen Mikroorganismus

handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um *E. coli* handelt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression unter aeroben Bedingungen erfolgt.
12. Rekombinantes lösliches Protein mit Citratlyase-Aktivität und einem Molekulargewicht von etwa 14.000 bis 15.000 Dalton erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Test-Kit zur Bestimmung von Zitronensäure, welcher im wesentlichen folgende Komponenten aufweist
 - (a) ein Protein mit Citratlyase-Aktivität erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
 - (b) mindestens ein Protein mit wasserstoffübertragender Aktivität,
 - (c) Nicotinamid-adenin-dinukleotid oder ein entsprechendes Derivat in reduzierter Form, und
 - (d) gegebenenfalls geeignete Stabilisatoren, Aktivatoren und/oder Substanzen zur Vermeidung bzw. Reduzierung von Störungen sowie Pufferlösungen.
14. Test-Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als wasserstoffübertragende Enzyme L-Malat-Dehydrogenase und gegebenenfalls L-Lactat-Dehydrogenase eingesetzt werden.
15. Verwendung des nach einem der Ansprüche 1 bis 11 erhältlichen Enzyms zur Bestimmung von Zitronensäure.

EPO - Munich
52

30. Sep. 1999

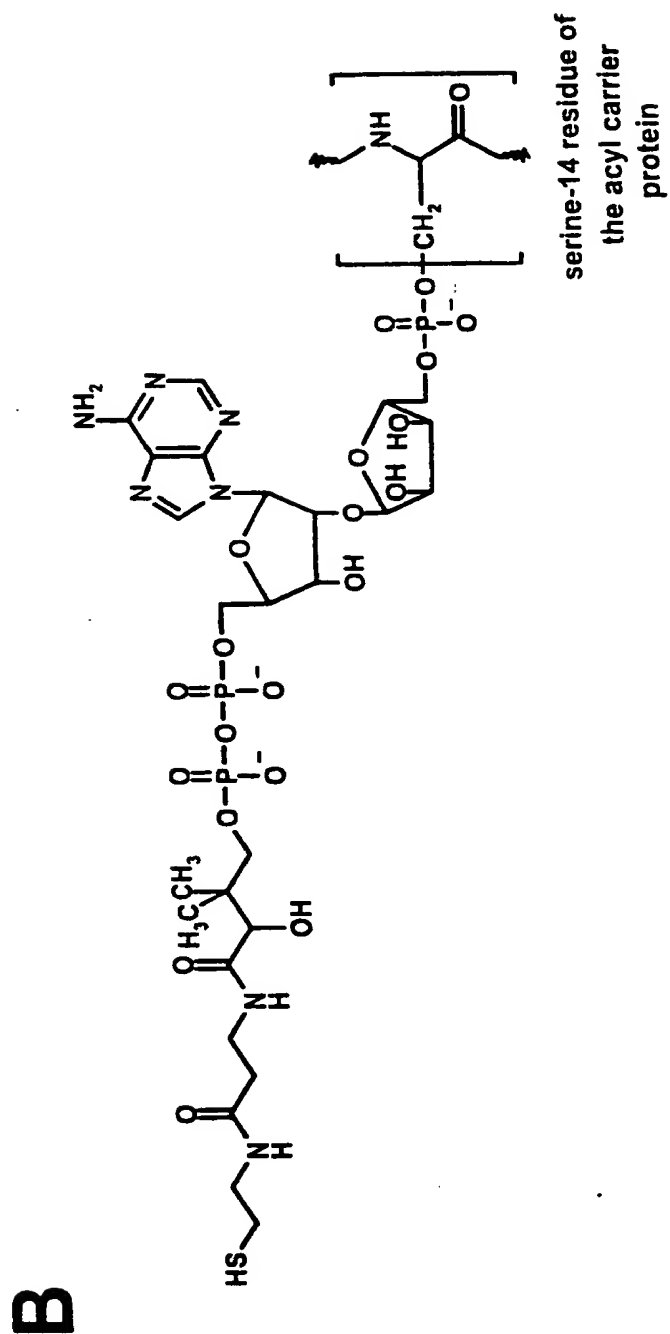
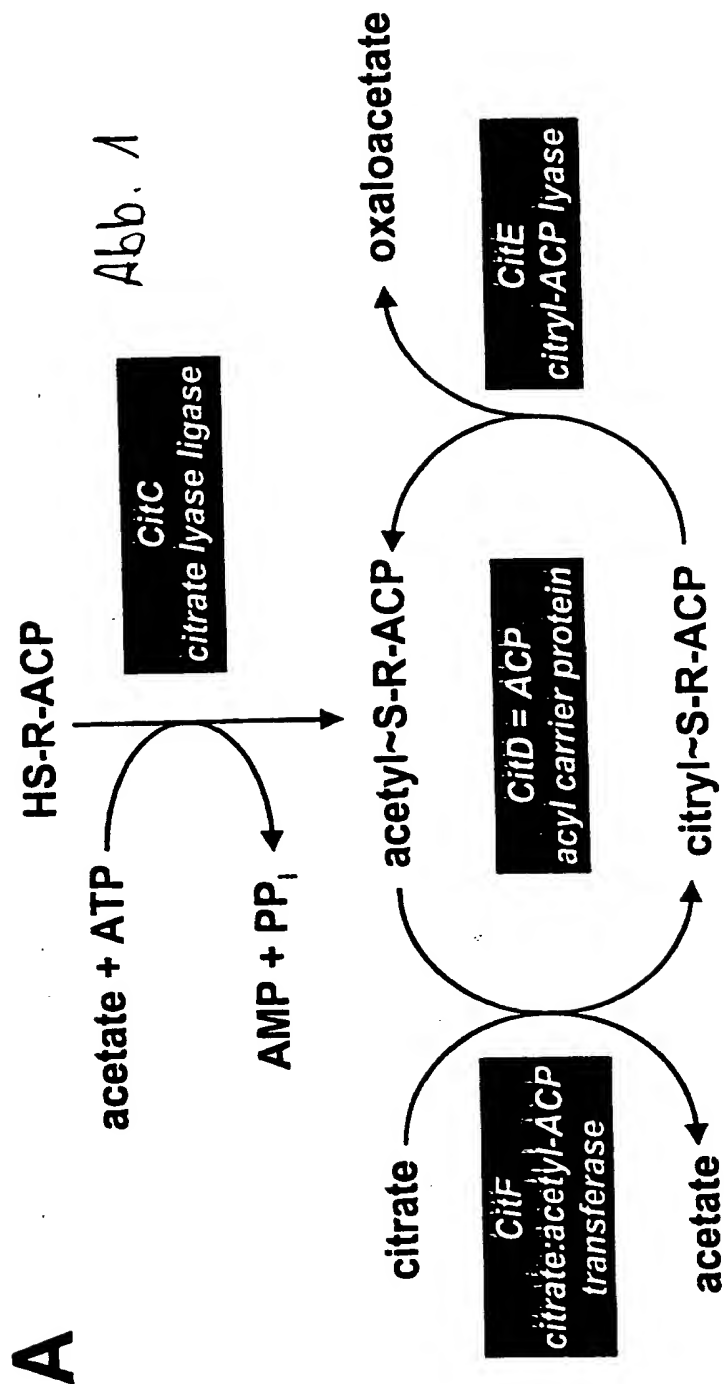


Abb. 2



1 kb

K.p.

Ligase Citrate lyase

*E.c.*

Ligase Citrate lyase

*H.i.*

Ligase Citrate lyase

*L.m.*

Ligase Citrate lyase

30. Sep. 1999

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit Citratlyase-Aktivität indem ein geeignetes Plasmid in einem Wirtsorganismus exprimiert wird und das Protein in aktiver Form isoliert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid die Information von einem aus mindestens sechs Genen bestehenden Gencluster sowie einen induzierbaren Promotor aufweist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des rekombinanten Enzyms und einen entsprechenden Testkit zur Bestimmung von Zitronensäure.

THIS PAGE BLANK (USPTO)